

EFEKTIVITAS *PRETREATMENT* ALKALI DAN HIDROLISIS ASAM ASETAT TERHADAP KARAKTERISTIK KOLAGEN DARI KULIT IKAN GABUS

Effectiveness of Alkaline Pretreatment and Acetic Acid Hydrolysis on the Characteristics of Collagen from Fish Skin of Snakehead

Wulandari^{*1}, Pipih Suptijah^{1,2}, Kustiariyah Tarman^{1,2}

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jalan Agatis No. 1, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622907

²Divisi Bioteknologi Kelautan, Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Baranangsiang, Jalan Raya Pajajaran No. 1, Bogor 16144
Jawa Barat, Telepon (0251) 8374816-8374820, Faks. (0251) 8374726

*Korespondensi: wulandaribe@gmail.com

Diterima: 2 Oktober 2015 / Disetujui: 16 Desember 2015

Abstrak

Kulit ikan merupakan salah satu byproduct hasil perairan yang berpotensi sebagai sumber alternatif kolagen. Penelitian ini bertujuan menentukan efektivitas *pretreatment* alkali dan asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan *C. striata*. Metode penelitian ini yaitu *pretreatment* alkali (NaOH) dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15 dan 0,2 M selama 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 jam. Konsentrasi asam asetat yang digunakan 0,05; 0,1; 0,15 dan 0,2 M dengan lama waktu perendaman 1 dan 2 jam. Rancangan percobaan yang digunakan untuk proses *pretreatment* NaOH dan asam asetat adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *pretreatment* NaOH konsentrasi 0,05 M selama 6 jam memberikan pengaruh nyata terhadap eliminasi protein non kolagen ($p < 0,05$), sedangkan untuk asam asetat terbaik dengan konsentrasi 0,1 M selama 2 jam berpengaruh signifikan terhadap derajat pengembangan dan tingkat kelarutan kolagen dari kulit ikan *C. striata*. Rendemen hasil ekstraksi sebesar 16% dengan karakteristik kecerahan warna 66,67%, kandungan protein 96,21%, viskositas 10 cP, suhu puncak pelelehan 159,9°C dan suhu transisi gelasi 78,55°C. Komposisi asam amino yang dominan yaitu glisina (27,11%), prolina (13,87%) dan alanina (12,58%). Gugus fungsi kolagen dari kulit ikan *C. striata* memiliki struktur β -sheet yang merupakan karakteristik khas kolagen.

Kata Kunci : Alkali, DSC, kolagen, *pretreatment*

Abstract

Fish skin is one of marine byproducts potential for alternative source of collagen. This study investigated the effectiveness of alkaline and acetic acid *pretreatment* on the characteristics of collagen from skin snakehead fish. The concentrations of alkaline *pretreatment* were 0.05; 0.1; 0.15 and 0.2 M for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours, acetic acid concentrations were 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M and 0.2 M for 1 and 2 hours. The experimental design used for alkaline and acetic acid *pretreatment* was factorial completely randomized design. The result showed that the concentration of alkaline 0.05 M for 6 hours have significant effect on the elimination of non-collagen protein ($p < 0.05$), whereas for the optimum acetic acid at a concentration 0.1 M for 2 hours significantly different on solubility and *swelling*. Extraction yields of collagen was 16%, with characteristics of whiteness 66.67%, protein content 96.21%, viscosity 10 cP, Tmax 159.9°C and glass transition temperature 78.55°C. The dominant amino acid composition were glycine (27.11%), proline (13.87%) and alanine (12.58%). Functional groups collagen from skin snakehead fish has β -sheet structure which is a characteristic of collagen.

Keywords: Alkaline, collagen, DSC, *pretreatment*

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan jaringan ikat matrik ekstraseluler yang keberadaannya berlimpah yaitu sekitar 30% dari total protein dalam suatu organisme (Gelse *et al.* 2003). Kolagen terdiri dari 27 tipe (Birk dan Bruckner 2005). Kolagen tipe I terdiri atas rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ yang merupakan komponen penyusun utama pada jaringan ikat tulang, kulit dan tendon (Muyonga *et al.* 2004). Unit struktur kolagen merupakan tropokolagen yang berbentuk batang terdiri atas 3 unit polipeptida, berperan dalam pembentukan struktur triple helix. Setiap rantai polipeptida terdiri dari Gly-X-Y, X dan Y kemungkinan besar adalah prolina dan hidroksiprolina (Ogawa *et al.* 2003).

Pemanfaatan kolagen cukup luas, baik di bidang farmasi, pangan, maupun kosmetik karena memiliki sifat biodegradable, biocompatible dan antigenitas rendah (Liu *et al.* 2009). Kolagen yang terdapat di pasaran saat ini umumnya berasal dari kulit dan tulang sapi, babi serta unggas. Penggunaan kolagen dari bahan tersebut memiliki kendala dari aspek kesehatan karena beresiko terkontaminasi Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) dan Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) (Jongjareonrak *et al.* 2005). Kendala dari aspek agama yaitu dilarangnya bagi umat Hindu dan Sikh menggunakan produk yang berasal dari sapi, sedangkan untuk umat Muslim dan Yahudi dilarang menggunakan produk berbahan dasar babi menyangkut masalah halal dan kosher (Shen *et al.* 2007). Kondisi tersebut membuka peluang untuk mencari alternatif kolagen dari sumber bahan baku lain. Bahan baku yang dapat digunakan sebagai sumber kolagen adalah kulit ikan.

Isolasi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan telah banyak dilakukan, baik di Indonesia maupun di luar negeri. Alhana *et al.* (2015) melakukan penelitian tentang

ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari teripang gamma dengan konsentrasi yang terbaik dengan larutan NaOH 0,3%. Salah satu jenis ikan yang dapat digunakan sebagai sumber kolagen adalah ikan *Channa striata*. Potensi kolagen dari kulit ikan *C. striata* didukung dengan jumlah tangkapan ikan *C. striata* di wilayah Sumatera Selatan secara berturut-turut dari tahun 2010-2013 yaitu 70.324 ton, 70.971 ton, 71.501 ton dan 73.450 ton (KKP 2013). Ikan *C. striata* di Sumatera Selatan secara umum dimanfaatkan sebagai bahan dasar industri makanan khas Palembang yaitu pempek, kerupuk, kemplang, tekwan dan model. Proses pengolahan menghasilkan by-products yang berpotensi dijadikan sebagai alternatif sumber kolagen seperti kulit, tulang, sisik dan gelembung renang.

Tahap isolasi kolagen terdiri proses *pretreatment* dengan alkali, hidrolisis dengan asam asetat serta ekstraksi. Perbedaan spesies dan habitat terutama suhu lingkungan sangat mempengaruhi proses *pretreatment* yang tidak hanya untuk mendapatkan kolagen dengan kemurnian sesuai standar, akan tetapi juga berkaitan dengan efisiensi biaya dan waktu dalam aplikasi (Liu *et al.* 2015). Informasi mengenai efektivitas *pretreatment* alkali dan hidrolisis dengan asam asetat terhadap kolagen dari kulit ikan *C. striata* belum pernah dilaporkan, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai efektivitas *pretreatment* alkali dan hidrolisis dengan asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan *C. striata*. Penelitian ini bertujuan menentukan konsentrasi dan lama perendaman kulit dalam larutan alkali (NaOH) dan asam asetat terbaik serta menentukan karakteristik kolagen dari kulit ikan *C. striata*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan pada

penelitian ini adalah kulit ikan *C. striata* diperoleh dari Pasar Kamboja, Palembang, Sumatera Selatan. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain NaOH (Merck), asam asetat (Merck), akuabides, akuades dan bahan analisa lainnya. Peralatan yang digunakan meliputi *freeze dryer* (Eyela FDU-1200, Tokyo, Japan), *Chromameter* (Minolta CR-310, Tokyo, Japan), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Bruker Tensor 37, Ettlingen, Germany), *High Performance Liquid Chromatography* (Water Cooperation, USA), *viscometer Brookfield* (USA), *waterbath incubator shaker* (BT 25 Yamato, Tokyo, Japan), dan spektrofotometer (DR 5000, Düsseldorf, Germany).

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap yaitu preparasi dan karakterisasi kimia kulit ikan *C. striata*; isolasi kolagen terdiri dari proses *pretreatment* dengan larutan NaOH, hidrolisis dengan asam asetat pada suhu ruang dan proses ekstraksi dengan akuabides pada suhu 40°C; karakterisasi kolagen dari ikan *C. striata* meliputi kandungan protein, komposisi asam amino, warna, gugus fungsi dengan FTIR, stabilitas thermal dengan DSC dan viskositas.

Preparasi dan Karakterisasi Kimia Kulit Ikan *C. striata*

Kulit ikan *C. striata* berasal dari ikan yang berukuran 0,5-2 kg/ekor. Kulit ditransportasikan ke laboratorium dalam kondisi beku, selanjutnya kulit di-*thawing* dan dibersihkan sisik, daging serta kotoran yang tersisa dengan pisau lalu dicuci hingga bersih. Kulit dipotong dengan ukuran kira-kira 0,5 x 0,5 cm² menggunakan gunting dan disimpan pada suhu *freezing* sampai kulit digunakan. Kulit ikan yang telah dibersihkan tersebut sebelum digunakan untuk tahap

selanjutnya terlebih dahulu dilakukan pengujian kimia meliputi proksimat (AOAC 2005), kandungan logam berat Pb dan Cd (BSN 2354.5-2011), Hg (BSN 01-2354.6-2006) serta As (BSN 01-4866-1998).

Isolasi Kolagen (Modifikasi Liu *et al.* 2015)

Proses isolasi kolagen terdiri 3 tahap yaitu *pretreatment* dengan larutan NaOH, hidrolisis dalam larutan asam asetat, dan ekstraksi dengan akuabides. Tahap pertama adalah proses *pretreatment* dengan larutan NaOH yang bertujuan untuk mengeliminasi protein non kolagen dan pengotor lain misalnya lemak, mineral, pigmen dan odor. Kulit ikan *C. striata* direndam dalam larutan NaOH dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15 dan 0,2 M selama 12 jam dan setiap 2 jam sekali larutan NaOH diganti dengan rasio antara kulit dan larutan NaOH adalah 1:10 (w/v). Larutan NaOH dari proses perendaman diuji protein dengan metode biuret dan BSA sebagai standar. Kulit ikan *C. striata* hasil perendaman NaOH terpilih dicuci hingga mendekati pH netral sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.

Tahap kedua adalah hidrolisis dengan larutan asam asetat. Konsentrasi asam asetat yang digunakan yaitu 0,05; 0,1; 0,15; dan 0,2 M selama 1 dan 2 jam perendaman. Rasio antara kulit dan larutan asam asetat adalah 1:20 (w/v). Parameter yang diuji pada hidrolisis kolagen ini adalah derajat pengembangan (DP) yang diukur dengan membandingkan pertambahan berat kulit setelah perendaman dan kulit sebelum perendaman, dan tingkat kelarutan kolagen yang diukur dengan menghitung jumlah kolagen yang terlarut selama perendaman lalu dioven dan ditimbang.

Tahap ketiga pada proses isolasi kolagen yaitu ekstraksi. Kulit hasil perendaman asam asetat terbaik dicuci dengan air mengalir hingga mencapai pH

netral sebelum digunakan untuk ekstraksi pada suhu 40°C selama 2 jam dengan rasio antara kulit dan aquabides adalah 1:2 (w/v). Hasil ekstraksi yang berupa kolagen, selanjutnya dikeringkan dengan *freeze dryer* untuk memperoleh kolagen dalam bentuk serbuk dan dihitung rendemennya.

Karakterisasi Kolagen

Karakterisasi kolagen yang dilakukan terdiri dari kandungan protein (AOAC 2005), komposisi asam amino HPLC (AOAC 1995), warna (modifikasi Shon *et al.* 2011), gugus fungsi dengan FTIR (Yan *et al.* 2008), stabilitas thermal (Martianingsih dan Atmaja 2009), dan viskositas (modifikasi Ahmad dan Benjakul 2010).

Analisis data (Mattjik dan Sumertajaya 2013)

Data yang diperoleh pada tahap deproteinasi dengan larutan NaOH dan tahap proses hidrolisis dengan asam asetat dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap pengamatan berulang (RAL in Time) menggunakan SAS 9.4. Perlakuan yang digunakan pada tahap deproteinasi dengan NaOH yaitu pemberian konsentrasi NaOH dengan taraf konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15 dan 0,2 M, dan satuan waktu pengamatan yang digunakan 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 jam. Respon yang diukur adalah nilai konsentrasi protein (mg/mL). Tahap hidrolisis dengan asam asetat menggunakan perlakuan konsentrasi asam asetat dengan taraf konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15 dan 0,2 M dan satuan waktu pengamatan yang digunakan 1 dan 2 jam. Respon yang diamati adalah derajat pengembangan dan tingkat kelarutan kolagen. Semua perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Data dari hasil perlakuan dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan apabila berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji

Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Kimia Kulit Ikan *C. striata*

Karakterisasi kimia pada bahan baku bertujuan untuk menilai kelayakan kulit ikan *C. striata* sebagai bahan baku dalam isolasi kolagen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air kulit ikan *C. striata* (77,18%) relatif lebih tinggi dari ikan tawar lain seperti ikan nila merah (70,43%), lele (62,47%), jambal siam (60,52%) (Jamilah *et al.* 2011), akan tetapi lebih rendah dari ikan patin (78,95%) (Rusli 2004). Kandungan protein kulit ikan *C. striata* (20,36%) lebih rendah dibandingkan dengan protein kulit ikan nila merah (29,07%), lele (31,01%), jambal siam (33,70%) (Jamilah *et al.* 2011). Persentase kadar air kulit ikan *C. striata* yang tinggi diduga karena proses penyimpanan beku yang mengakibatkan air masuk ke dalam struktur jaringan kulit ikan sehingga menyebabkan kerusakan kandungan protein kulit ikan.

Penelitian Amiza dan Aishah (2011) menyatakan bahwa kandungan protein gelatin dari kulit cobia kering (93,14%) lebih tinggi dari gelatin kulit ikan cobia beku (79,12%). Fernández-Díaz *et al.* (2003) menyatakan bahwa penurunan kandungan protein disebabkan oleh rusaknya jaringan kulit ikan akibat proses kristalisasi es yang terbentuk selama proses pembekuan.

Kadar abu kulit ikan *C. striata* (0,67%) lebih besar dibandingkan dengan kulit ikan nila merah (0,51%), lele (0,52%) dan jambal siam (0,46%) (Jamilah *et al.* 2011). Kadar lemak kulit ikan *C. striata* (1,42%) lebih rendah dibandingkan dengan kulit ikan patin (12,54%) (Rusli 2004), kulit ikan tuna (18,3%) (Shyni *et al.* 2014). Tingginya kandungan mineral pada kulit ikan *C. striata* sebagai bahan baku untuk

kolagen memerlukan proses *pretreatment* sehingga kolagen yang dihasilkan memenuhi standar dan mudah dalam aplikasi. Songchotikunpan *et al.* (2008) menyatakan bahwa perbedaan komposisi kimia pada kulit ikan dipengaruhi oleh umur, spesies, jenis kelamin dan teknik preparasi.

Cemaran logam berat berbahaya untuk produk baik pangan, farmasi, maupun kosmetik. Kandungan logam berat Pb kulit ikan *C. striata* (<0,005 mg/kg), Hg (<0,002 mg/kg), Cd (0,0514 mg/kg) dan As (<0,002 mg/kg). Kulit ikan *C. striata* layak digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan kolagen karena kadar logam beratnya masih di bawah standar yang ditetapkan BSN 8076:2014 tentang syarat mutu dan pengolahan kolagen kasar dari sisik ikan yaitu Pb (0,4 mg/kg), Hg (0,5 mg/kg), Cd (0,1 mg/kg), dan As (1,0 mg/kg).

Isolasi Kolagen

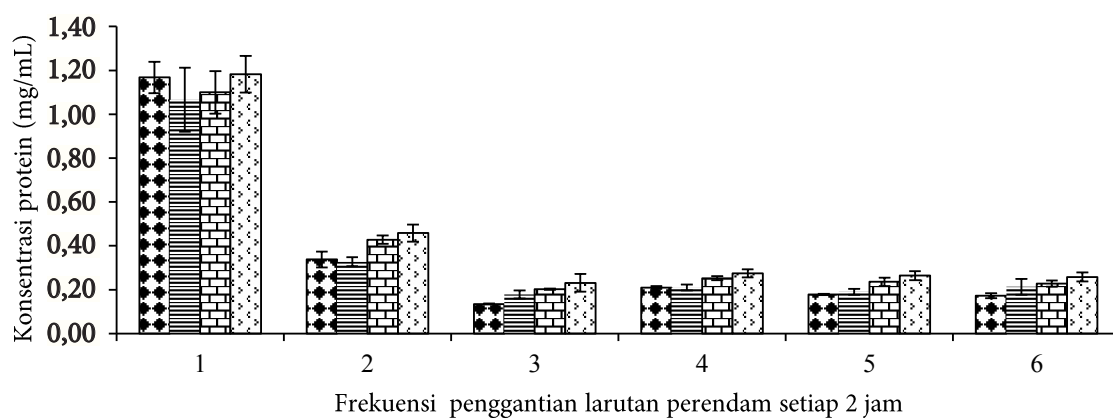
Pretreatment kulit dalam larutan NaOH

Penentuan perlakuan terbaik proses *pretreatment* kulit dalam larutan NaOH dilakukan berdasarkan perbedaan konsentrasi NaOH dan lama waktu perendaman. Total protein dari kombinasi

perlakuan antara konsentrasi NaOH dan waktu perendaman 2 jam menunjukkan konsentrasi protein yang tinggi dan nilai kandungan protein semakin menurun seiring dengan penambahan waktu perendaman (Gambar 1).

Kandungan protein terendah terdapat pada kombinasi perlakuan antara konsentrasi NaOH 0,05 M dan waktu perendaman 6 jam yaitu 0,1329 mg/mL. Total konsentrasi protein pada perendaman dengan laturan NaOH 0,05 dan 0,1 M lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi NaOH 0,15 dan 0,2 M. Konsentrasi protein yang tinggi tersebut diduga karena sebagian protein kolagen tereliminasi. Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa penggunaan konsentrasi NaOH 0,2 dan 0,5 M dapat menghilangkan protein dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 0,05 dan 0,1 M.

Perendaman dalam larutan NaOH mengakibatkan pengembangan (*swelling*) pada kulit ikan *C. striata*. Larutan NaOH memecah sebagian besar daerah telopeptida dari molekul kolagen selama proses *pretreatment* (Yoshimura *et al.* 2000), sehingga terjadinya sedikit *swelling* pada kulit yang disebabkan oleh reaksi kulit dengan NaOH, yang menyebabkan



Gambar 1 Konsentrasi protein dalam larutan NaOH sisa perendaman kulit ikan gabus setiap 2 jam perendaman: (▨) NaOH 0,05 M; (■) NaOH 0,1 M; (▤) NaOH 0,15 M (▥) NaOH 0,2 M

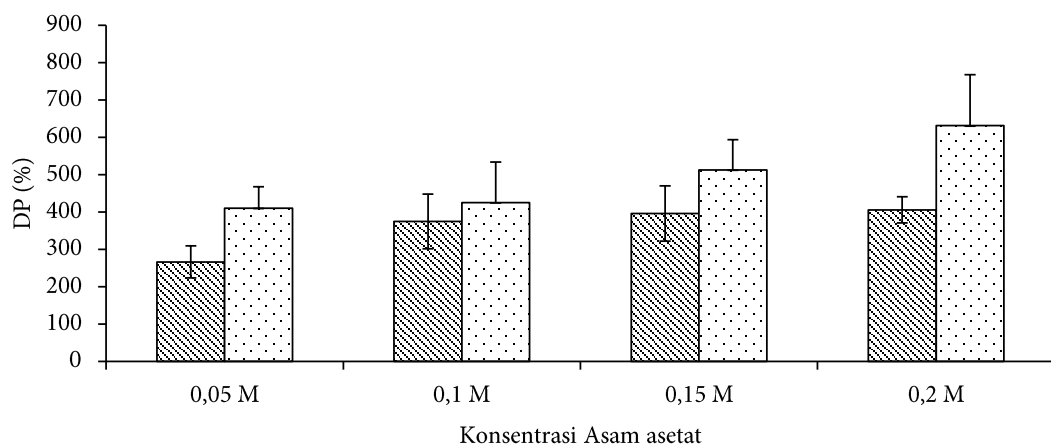
pereaksi melarutkan gugus OH yang berikatan dengan protein (Jaswir *et al.* 2011). Kondisi tersebut memungkinkan terjadinya migrasi protein non kolagen dan komponen pengotor lain yang awalnya terdapat dalam matrik kolagen akan mudah terlepas (Cho *et al.* 2005). Peristiwa tersebut menyebabkan larutan NaOH yang digunakan untuk merendam kulit ikan berubah warnanya menjadi coklat muda.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi NaOH dan lama waktu perendaman berpengaruh terhadap eliminasi protein, sedangkan interaksi keduanya tidak berpengaruh. Hasil uji lanjut DMRT perlakuan konsentrasi larutan NaOH 0,05 dan 0,1 M tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), sedangkan konsentrasi 0,15 dan 0,2 M berbeda nyata ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut DMRT perlakuan lama waktu perendaman kulit ikan *C. striata* dalam larutan NaOH pada proses eliminasi protein kolagen berbeda nyata pada jam kedua dan keempat ($p < 0,05$), akan tetapi tidak berbeda nyata pada jam ke-6, 8, 10 dan 12 ($p > 0,05$). Perlakuan terpilih tahap *pretreatment* NaOH adalah kombinasi konsentrasi NaOH 0,05 M dan lama waktu perendaman 6 jam. Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa efisiensi *pretreatment* dalam larutan NaOH

dipengaruhi oleh waktu, suhu, konsentrasi NaOH dan bahan baku yang digunakan.

Hidrolisis dalam Larutan Asam Asetat

Kulit dari perlakuan terpilih pada *pretreatment* NaOH dicuci hingga pH netral dan dilanjutkan ke proses hidrolisis dalam larutan asam asetat. Hidrolisis menggunakan larutan asam asetat mengakibatkan kulit mengembang (*swelling*) dan juga terjadi kelarutan kolagen. Berdasarkan hasil penelitian, derajat pengembangan kulit ikan *C. striata* semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi larutan asam asetat yang digunakan dan lama waktu perendaman (Gambar 2). Nilai derajat pengembangan terkecil terdapat pada konsentrasi asam asetat 0,05 M dan waktu perendaman 1 jam yaitu 266,48%, sedangkan nilai derajat pengembangan tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan antara konsentrasi asam asetat 0,2 M dan lama waktu perendaman 2 jam yaitu 631,43%. Tingkat *swelling* kulit ikan *C. striata* pada konsentrasi 0,2 M yang tinggi diduga karena semakin banyak air yang berpenetrasi ke dalam jaringan kulit, sesuai dengan hasil penelitian Nur'aenah (2013) dimana derajat pengembangan kulit ikan pari meningkat ketika semakin



Gambar 2 Derajat pengembangan (DP), (■) waktu perendaman 1 jam; (▨) waktu perendaman 2 jam

tinggi konsentrasi asam asetat dan semakin lama waktu perendaman.

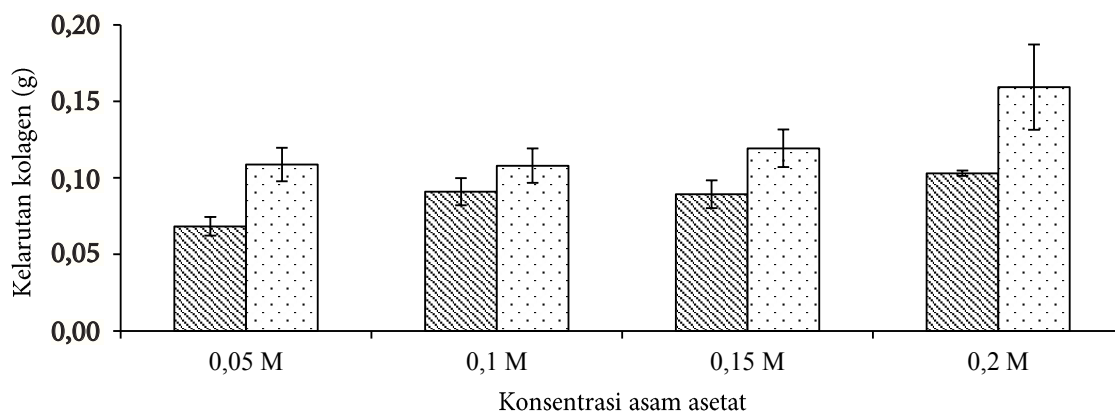
Jaswir *et al.* (2011) menyatakan bahwa proses pengembangan kulit ikan yang direndam di dalam asam asetat terjadi akibat penetrasi air ke dalam struktur kulit. Penggunaan larutan asam asetat akan meningkatkan ion H^+ , kondisi tersebut membantu air masuk ke dalam struktur kulit melalui gaya elektrostatis antara gugus polar (pengembangan elektrostatis) atau ikatan hidrogen antara gugus polar dan atom negatif (hidrasi liotropik). Pembengkakan struktur kulit ikan ini penting karena berpengaruh terhadap utuhnya struktur serat tropokolagen menjadi prokolagen melalui terganggunya ikatan non kovalen dan pada akhirnya memudahkan kelarutan kolagen pada proses ekstraksi.

Hasil analisis sidik ragam derajat pengembangan kulit ikan *C. striata* selama perendaman menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi asam asetat dan lama waktu perendaman berpengaruh nyata terhadap derajat pengembangan (DP) kulit ikan *C. striata* ($p < 0,05$). Kombinasi perlakuan antara konsentrasi asam asetat dan lama waktu perendaman tidak berpengaruh nyata terhadap pengembangan kulit ikan *C. striata* ($p > 0,05$).

Hasil pengamatan terhadap tingkat

kelarutan kolagen menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi asam asetat dan semakin lama waktu perendaman maka tingkat kelarutan kolagen kulit ikan *C. striata* semakin tinggi (Gambar 3). Perendaman kulit ikan dengan konsentrasi asam asetat 0,2 M selama 2 jam mengakibatkan kelarutan kolagen tertinggi yaitu 0,159 g. Kolagen terlarut dalam asam asetat sehingga berakibat rendahnya rendemen kolagen yang dihasilkan. Nur'aenah (2013) melaporkan bahwa penggunaan konsentrasi asam asetat 0,2 M menyebabkan tingginya tingkat kelarutan kolagen. Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa ASC (acid soluble collagen) dari kulit ikan karper terlarut secara sempurna pada konsentrasi asam asetat 0,5 M. Konsentrasi asam asetat menentukan nilai pH larutan sehingga mengatur tingkat kerapatan muatan kolagen yang mempengaruhi interaksi elektrostatis dan struktur kolagen dan menentukan tingkat kelarutan serta ekstraktibilitas kolagen dari jaringan kulit ikan.

Hasil analisis sidik ragam tingkat kelarutan kolagen kulit ikan *C. striata* menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu perendaman dan konsentrasi asam asetat berpengaruh signifikan terhadap kelarutan kolagen ($p < 0,05$), sedangkan interaksi keduanya tidak



Gambar 3 Tingkat kelarutan kolagen selama waktu perendaman, (▨) waktu perendaman 1 jam; (▤) waktu perendaman 2 jam

berpengaruh signifikan ($p>0,05$). Hasil uji lanjut DMRT (5%) perlakuan lama waktu perendaman 1 dan 2 jam berbeda nyata terhadap tingkat kelarutan kolagen, sedangkan untuk perlakuan konsentrasi asam asetat 0,05 dan 0,1 M tidak berbeda nyata, akan tetapi perlakuan konsentrasi asam asetat 0,1; 0,15 dan 0,2 M berbeda nyata. Berdasarkan kondisi tersebut maka perlakuan terpilih pada tahap ini adalah konsentrasi asam asetat 0,1 M dan lama waktu perendaman 2 jam dengan jumlah kelarutan kolagen 0,108 g dan derajat pengembangan 425,28%. Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa tingkat kelarutan kolagen dipengaruhi oleh ekstraktibilitas kulit ikan. Konsentrasi asam asetat dapat mengubah nilai pH. Nilai pH mengatur kerapatan muatan protein yang akan mengubah struktur protein dan interaksi elektrostatik.

Ekstraksi

Perlakuan terpilih dari proses *pretreatment* NaOH dan hidrolisis dengan asam asetat dilanjutkan dengan pencucian sampai pH netral sebelum diekstraksi dengan akuabides. Proses netralisasi ini bertujuan untuk menghasilkan kolagen dengan nilai pH mendekati netral

sehingga mudah dalam aplikasi. Proses ekstraksi dilakukan pada suhu 40°C selama 2 jam. Ekstraksi dengan suhu 40°C menyebabkan berlanjutnya pemecahan ikatan hidrogen dan kovalen, sehingga prokolagen berubah strukturnya menjadi kolagen.

Penggunaan suhu ekstraksi 40°C ini bertujuan untuk menghindari denaturasi lanjut sehingga kolagen menjadi gelatin. Sai *et al.* (2012) menyatakan bahwa suhu denaturasi kolagen menjadi gelatin adalah 45°C. Suhu ekstraksi di atas 40°C merupakan suhu transisi gulungan triple helix berubah menjadi random coil (α -helix) yang merupakan ciri khas gelatin (Djabourov *et al.* 1993).

Karakteristik Kolagen Rendemen

Rendemen merupakan parameter penting yang menunjukkan keefektifan suatu bahan baku dikonversi menjadi produk. Rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan berat kering kolagen yang dihasilkan dengan berat basah kulit yang telah dibersihkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen kolagen dari kulit ikan *C. striata* lebih tinggi dari beberapa jenis kulit ikan lainnya (Tabel 1).

Tabel 1 Rendemen kolagen dari kulit ikan *C. striata* dan beberapa kulit ikan lainnya

Sumber kolagen	Jenis Asam Lemak	Rendemen % (bb)
Kulit ikan <i>C. striata</i> ¹	<i>Water soluble collagen</i>	16,00
Kulit ikan pari ²	<i>Water soluble collagen</i>	14,48
Kulit ikan cucut bambu ³	<i>Water soluble collagen</i>	12,52
Kulit ikan buntal pisang ⁴	<i>Water soluble collagen</i>	8,65
Kulit ikan kobia ⁵	<i>Water soluble collagen</i>	10,51
Kulit ikan marlin ⁶	<i>Acid soluble collagen</i>	5,76
Kulit ikan marlin ⁶	<i>Pepsin soluble collagen</i>	2,11
Kulit ikan karper kepala besar ⁷	<i>Pepsin soluble collagen</i>	17,50
Kulit ikan patin ⁸	<i>Acid soluble collagen</i>	5,10
Kulit ikan patin ⁸	<i>Pepsin soluble collagen</i>	7,70

Keterangan: ¹Data hasil penelitian; ²Nur'aenah (2013); ³Mahardika (2013); ⁴Faisal (2014); ⁵Ariesta (2014);

⁶Tamilmozhi *et al.* (2013); ⁷Liu *et al.* (2012); Singh *et al.* (2011)

Nilai rendemen kolagen dari kulit ikan *C. striata* yang tinggi diduga karena tingginya persentase derajat pengembangan kulit dan rendahnya tingkat kelarutan kolagen selama proses *pretreatment*.

Shyni *et al.* (2014) menyatakan bahwa kulit ikan cucut yang mengembang lebih besar pada proses *pretreatment* basa dan asam dibandingkan dengan kulit ikan rohu dan tuna sehingga menghasilkan rendemen yang lebih tinggi, hal ini terjadi karena meningkatnya jumlah cross-link yang terbuka pada saat pengembangan kulit. Ratnasari *et al.* (2013) menyatakan bahwa perbedaan jenis kulit, konsentrasi asam, pH, dan jumlah kolagen yang terbuang selama proses *pretreatment* dan pencucian yang menyebabkan perbedaan persentase rendemen yang dihasilkan. Jamilah dan Harvinder (2002) menyatakan bahwa rendahnya nilai rendemen terjadi akibat proses leaching kolagen selama proses pencucian atau denaturasi selama proses ekstraksi.

Kandungan Protein

Kolagen dari kulit ikan *C. striata* dari hasil penelitian ini mengandung protein sebesar 96,21%. Kandungan protein kolagen kulit ikan *C. striata* yang tinggi ini diduga proses *pretreatment* dengan larutan NaOH 0,05 M mampu menghilangkan protein non kolagen dan zat pengotor lainnya secara optimal. Kittiphattanabawon *et al.* (2010) juga menyatakan bahwa *pretreatment* dengan NaOH 0,1 M efektif mengeliminasi protein non kolagen.

Persentase kandungan protein kolagen dari kulit ikan *C. striata* ini lebih tinggi dibandingkan dengan kolagen kulit ikan pari (86,97%) (Nur'aenah 2013), ASC dan PSC dari kulit ikan cucut (89,81% dan 89,89%) (Kittiphattanabawon *et al.* 2010), kolagen dari kulit ikan kakap (94%) (Kittiphattanabawon *et al.* 2005), ASC dan PSC dari sirip ikan skipjack tuna (94,84%

dan 93,04%) (Di *et al.* 2014). Kandungan protein kolagen kulit ikan *C. striata* ini memenuhi standar kolagen yang ditetapkan BSN 8076:2014 tentang syarat mutu dan pengolahan kolagen kasar dari sisik ikan yaitu >75%.

Warna

Warna merupakan estetika penting untuk kolagen. Warna kolagen sangat dipengaruhi oleh bahan baku dan juga metode *pretreatment* yang digunakan. Secara umum, warna kolagen tidak berpengaruh terhadap sifat fungsional, akan tetapi warna kolagen yang putih lebih diminati karena lebih mudah dalam penggunaannya tanpa harus menambahkan pewarna untuk produk akhir.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kolagen dari kulit ikan *C. striata* memiliki derajat putih 66,67%. Nilai derajat putih kolagen dari kulit ikan *C. striata* tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kolagen dari kulit ikan pari (72,48%) (Nur'aenah 2013) dan kolagen dari kulit ikan skate (88,4%) (Shon *et al.* 2011), namun lebih tinggi dari ASC dan PSC kulit ikan kakap putih yaitu 65,41 dan 61,33% (Jamilah *et al.* 2013). Derajat putih pada kolagen kulit ikan *C. striata* yang rendah diduga kurang optimalnya proses *pretreatment* dengan NaOH sehingga pigmen yang terdapat pada kulit belum tereliminasi secara sempurna.

Muyonga *et al.* (2004) menyatakan bahwa efisiensi proses filtrasi berpengaruh terhadap warna larutan gelatin yang dihasilkan. Warna gelap pada kolagen tidak dapat dihilangkan secara keseluruhan karena kulit ikan mengandung pigmen. Metode yang efektif untuk mengeliminasi pigmen dari kulit ikan yaitu *pretreatment* dengan larutan asam organik Shon *et al.* 2011). Jaswir *et al.* (2011) menyatakan bahwa perendaman dengan larutan asam atau basa menyebabkan

pengembangan pada kulit sehingga pigmen di dalam kulit ikan akan mudah dieliminasi.

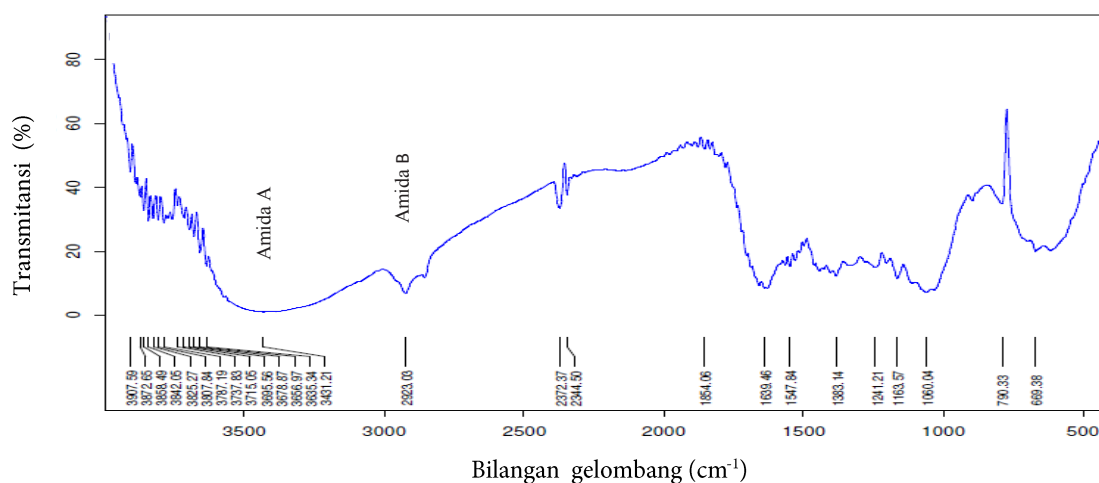
Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

Hasil analisis gugus fungsi dengan spektroskopi FTIR kolagen dari kulit ikan *C. striata* yang menunjukkan puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III (Gambar 4). Wilayah puncak serapan amida A secara umum berada pada kisaran 3400-3440 cm^{-1} yang merupakan stretching dari gugus N-H (Veruuraj *et al.* 2013), ketika gugus N-H berikatan dengan ikatan hidrogen maka puncak serapan lebih rendah yaitu 3300 cm^{-1} (Li *et al.* 2004). Wilayah puncak serapan amida A kolagen dari kulit ikan *C. striata* yaitu 3431,21 cm^{-1} , maka tidak terdapat gugus NH yang berikatan dengan ikatan hidrogen. Amida B kolagen dari kulit ikan *C. striata* terletak pada panjang gelombang 2923,03 cm^{-1} . Veruuraj *et al.* (2013) menyatakan bahwa puncak serapan amida B berada pada kisaran 2922-2924 cm^{-1} yang merupakan stretching asimetris dari gugus CH_2 .

Wilayah puncak serapan amida I kolagen dari kulit ikan *C. striata* yaitu 1639,46 cm^{-1} . Amida I secara umum

mempunyai puncak serapan pada kisaran 1600-1700 cm^{-1} yang merupakan karakteristik dari stretching vibrasi dari gugus karbonil (ikatan $\text{C}=\text{O}$) yang berada disepanjang polipeptida, yang merupakan ciri khas struktur sekunder dari peptida (Surewicz dan Mantsch 1988). Wilayah puncak serapan 1630, 1650 dan 1675 cm^{-1} merupakan karakteristik dari residu asam imino (β -sheet), random coil dan β -turn (Prystupa dan Donald 1996). Muyonga *et al.* (2004) menyatakan bahwa amida I memiliki 4 komponen struktur sekunder protein yaitu α -heliks, β -sheet, β -turn, dan random coil. Kolagen dari kulit ikan *C. striata* memiliki struktur β -sheet yang belum terdenaturasi menjadi α -helix yang merupakan ciri khas gelatin.

Amida II dan III kolagen kulit ikan *C. striata* memiliki panjang gelombang 1547,84 cm^{-1} dan 1241,21 cm^{-1} . Hasil analisis menunjukkan bahwa gugus amida II kolagen dari kulit *C. striata* hampir sama dengan ASC dari kulit ikan patin yaitu 1551 cm^{-1} , dan amida III ASC dan PSC dari kulit ikan patin yaitu 1242 dan 1244 cm^{-1} (Singh *et al.* 2011). Puncak serapan amida II dan III secara berturut-turut berada pada kisaran 1480-1575 cm^{-1} dan 1229-1301 cm^{-1} (Kong dan Yu 2007). Liu *et al.* (2007) menyatakan bahwa puncak



Gambar 4 *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy* kolagen dari kulit ikan *C. striata*

serapan diantara 1236 dan 1452 cm^{-1} menunjukkan keberadaan struktur helik.

Komposisi Asam Amino

Komposisi asam amino kolagen dari kulit ikan *C. striata* dinyatakan dalam per 1000 total residu (Tabel 2). Secara umum, kandungan asam amino tertinggi yaitu glisina (27,11%), diikuti dengan prolina (13,87%), alanina (12,58%) dan glutamat (11,82%), sedangkan kandungan asam amino terendah yaitu tirosina (0,46%) dan histidina (0,66%). Muyonga *et al.* (2004) menyatakan bahwa glisina merupakan asam amino yang paling dominan dalam kolagen, dan semua jenis kolagen ditandai dengan pengulangan tripeptida (Gly-X-Y), X adalah prolina dan Y adalah hidroksiprolina yang bertanggung jawab dalam pembentukan triple helix.

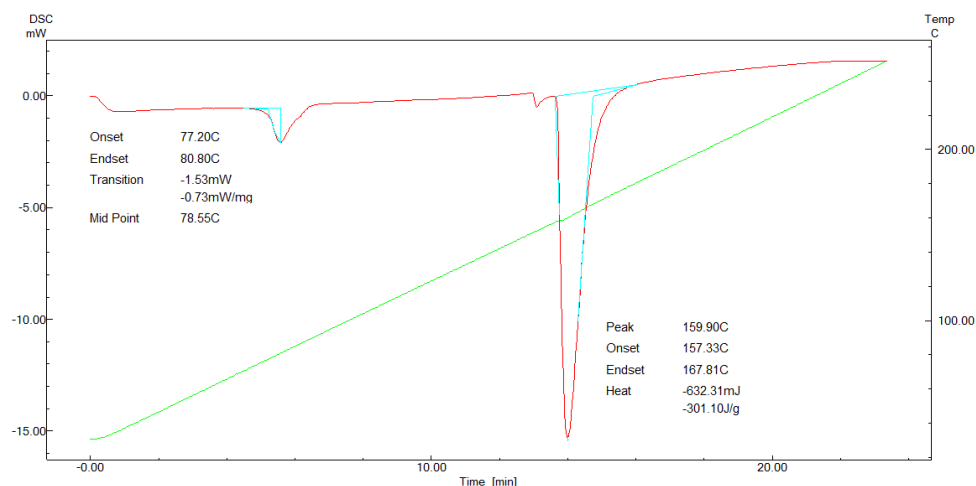
Kandungan prolina kolagen kulit ikan *C. striata* lebih tinggi dibandingkan kolagen dari kulit ikan patin (12%) (Singh *et al.* 2011), kulit ikan cucut (11,3%) (Kittiphattanabawon *et al.* 2010) dan kulit ikan amur sturgeon (11,59%) (Wang *et al.* 2014). Prolina yang tinggi pada kolagen akan meningkatkan stabilitas thermal (Munyonga *et al.* 2004). Tamilmozhi *et al.* (2013) menyatakan bahwa prolina merupakan asam imino yang unik pada kolagen karena berperan dalam menjaga integritas struktural kolagen. Huang *et al.* (2011) menyatakan bahwa cincin pirolidin asam imino prolina dan hidroksiprolina membatasi konformasi rantai polipeptida dan membantu memperkuat stabilitas thermal triple helix. Kolagen tipe I dari kulit ikan *C. striata* kurang stabil terhadap panas karena memiliki total asam imino lebih rendah yaitu 138,66/1000 residu dibandingkan dengan kolagen tipe I dari kulit sapi yang memiliki jumlah asam imino 216,60/1000 residu (Di *et al.* 2014).

Viskositas

Viskositas merupakan ukuran

kekentalan suatu fluida yang menyatakan besar kecilnya ketahanan fluida terhadap perubahan gaya. Pengukuran viskositas dilakukan dengan cara melarutkan kolagen dalam asam asetat 0,1 M dengan konsentrasi 0.3% (b/v) (Ahmad dan Benjakul 2010). Nilai viskositas kolagen dari kulit ikan *C. striata* dalam penelitian ini adalah 10 cP pada suhu ruang, dan relatif lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Ahmad dan Benjakul (2010) yang menghasilkan kolagen dari tuna albakor dengan nilai viskositas 22,8 cP, kolagen dari yellowfin tuna 21,1 cP, dan kolagen dari babi 19,6 cP pada suhu 40°C. Viskositas kolagen dari tuna albakor dan yellow tuna menurun ketika suhu dinaikkan menjadi 32°C. Penurunan nilai viskositas pada suhu 32°C disebabkan rusaknya ikatan hidrogen yang berperan dalam menjaga stabilitas struktur kolagen.

Nilai viskositas kolagen yang rendah dari kulit ikan *C. striata* ini diduga terjadi denaturasi protein selama proses *pretreatment* dan juga proses ekstraksi pada suhu 40°C. Ogawa *et al.* (2004) menyatakan bahwa tinggi nilai viskositas pada larutan kolagen disebabkan oleh tingginya kandungan rantai β dan γ , sedangkan rendahnya nilai viskositas tersebut disebabkan oleh denaturasi kolagen akibat temperatur tinggi. Ahmad dan Benjakul (2010) menyatakan bahwa tinggi nilai kolagen dari kulit ikan tuna albakor disebabkan tingginya proporsi inter dan intramolekul cross-link yang menstabilkan struktur kolagen. Gurdak *et al.* (2006) menyatakan bahwa seiring dengan peningkatan suhu maka ikatan hidrogen pada kolagen rusak, dan sebagai konsekuensinya struktur triple helix kolagen yang disusun oleh ikatan hidrogen menjadi konfigurasi random coil yang merupakan ciri khas gelatin melalui proses depolimerisasi thermal yang mana akan diikuti oleh perubahan sifat fisik kolagen seperti viskositas.



Gambar 5 Kurva termogram DSC kolagen dari kulit ikan *C. striata*

Analisis Thermal

Thermogram Differential Scanning Calorimetry (DSC) kolagen dari kulit ikan *C. striata* dapat dilihat pada Gambar 5. DSC merupakan salah satu cara untuk mengukur suhu eksotermik kolagen. Berdasarkan kurva termogram terlihat bahwa kolagen dari kulit ikan *C. striata* memiliki dua puncak eksotermis. Puncak eksotermis pertama menunjukkan suhu transisi gelas dimana ikatan hidrogen pada kolagen terputus sehingga terjadi pembentukan polimer amorf yaitu gelatin, sedangkan puncak eksotermis kedua menunjukkan suhu puncak pelelehan (T_{max}). Suhu transisi gelas kolagen dari kulit ikan *C. striata* yaitu 78,55°C dan T_{max} yaitu 159,9°C, sedangkan suhu awal dan akhir pelelehan adalah 157,33°C dan 167,81°C.

Suhu transisi gelas dan suhu puncak pelelehan kolagen dari kulit ikan *C. striata* ini lebih rendah dari suhu gelasi kolagen dari kulit ikan pari yaitu 88,92°C dan 165,88°C (Nur'aenah 2013). Suhu transisi gelas dan suhu puncak pelelehan kolagen yang rendah dari kulit ikan *C. striata* ini diduga karena rendahnya kandungan asam amino prolina. Bae *et al.* (2008) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara thermostabilitas kolagen dari hasil

perairan dan kandungan asam imino (prolina dan hidroksiprolina), kolagen yang memiliki kandungan asam imino tinggi maka akan lebih tahan terhadap panas.

KESIMPULAN

Pretreatment NaOH terpilih yaitu perlakuan konsentrasi NaOH 0,05 M dan lama waktu perendaman 6 jam diperoleh konsentrasi protein terendah (0,1329 mg/mL). Kombinasi perlakuan asam asetat dengan konsentrasi 0,1 M selama 2 jam diperoleh tingkat kelarutan yang kecil (0,108 g) dan derajat pengembangan tinggi (425%). Rendemen hasil ekstraksi sebesar 16% dengan karakteristik kecerahan warna 66,67%, viskositas 10 cP, suhu puncak pelelehan 159,90°C dan suhu transisi gelasi 78,55°C. Komposisi asam amino yang dominan yaitu glisina (27,11%), prolina (13,87%) dan alanina (12,58%). Gugus fungsi kolagen yang dihasilkan memiliki struktur β -sheet yang merupakan karakteristik khas kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

Alhana, Suptijah P, Tarman K. 2015. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*)

- Amiza MA, Aishah S. 2011. Effect of drying and freezing of cobia (*Rachycentron canadum*) skin on its gelatin properties. *International Food Research Journal* 18:159-166.
- Andarwulan N, Kusnandar F, Herawati D. 2011. *Analisis Pangan*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Ahmad M, Benjakul S. 2010. Extraction and characterization of pepsin soluble collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry* 120:817-824.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1995. Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical of Chemist. Arlington, Virginia, USA : Published by The Association of Official Analytical Chemist. Inc.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official Method of Analysis (18 Edn). Arlington, Virginia, USA : Published by The Association of Official Analytical Chemist. Inc.
- Ariesta C. 2014. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan cobia (*Rachycentron canadum*) [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry* 108: 49-54.
- Birk DE, Bruckner P. 2005. Collagen suprastructures. *Topics in Current Chemistry* 247:185-205.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1998. Cara uji cemaran arsen dalam makanan: SNI 01- 4866-1998. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2006. Cara uji kimia Bagian 6: Penentuan kadar logam berat merkuri (Hg) pada produk perikanan: SNI 01-2354.6-2006. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2011. Cara uji kimia Bagian 5: Penentuan kadar logam berat timbal (Hg) dan kadmium (Cd) pada produk perikanan: SNI 2354.5-2011. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2014. Kolagen kasar dari sisik ikan- Syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Cho SM, Gu YS, Kim SB. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19:221-229.
- Di Y, Chang-Feng C, Bin W, Guo-Fang D, Rui LZ. 2014. Characterization of acid and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines* 12:0712-0720.
- Djabourov M, Lechaire J, Gaill F. 1993. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology* 30:191-205.
- Faisal F. 2014. Isolasi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan buntal pisang (*Tetraodon lunaris*). [skripsi]. Bogor: institut Pertanian Perikanan.
- Fernández-Díaz MD, Montero P, Gómez-Guillén MC. 2003. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids* 17:281-286.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Delivery Reviews* 55:1531-1546.
- Gurdak E, Booth J, Robert CJ, Rouxhet PG, Gillian CCD. 2006. Influence of collagen denaturation on the nanoscale organization of adsorbed layers. *Journal of Colloid and Interface Science* 302:475-484.

- Huang YR, Shiau CY, Chen HH, Huang BC. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids* 25:1507-1513.
- Jamilah B, Harvinder KG. 2002. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry* 77:81-84.
- Jamilah B, Tan KW, Hartina MRU, Azizah A. 2011. Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids* 25:1256-1260.
- Jamilah B, Hartina MRU, Hashim M, Sazili AQ. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal* 20(2):835-842.
- Jaswir I, Monsur HA, Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal of Biotechnology* 10(81):18847-18854.
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry* 93(3):475-484.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry* 89:363-372.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Shahidi F. 2010. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry* 119:1519-1526.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2013. Kelautan dan Perikanan dalam Angka. Jakarta: Pusat Data, Statistik dan Informasi, Sekretariat Jenderal, kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(8):549-559.
- Li H, Liu BL, Gao LZ, Chen HL. 2004. Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry* 84:65-9.
- Liu HY, Li D, Guo SD. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry* 101:621-625.
- Liu W, Li G, Miao Y, Wu X. 2009. Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry* 33:20-37.
- Liu DS, Liang L, Regenstien JM, Zhou P. 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry* 133:1441-1448.
- Liu D, Zhou P, Li T, Regenstien JM. 2014. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. *Food Hydrocolloids* 41:290-297.
- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstien JM, Zhou P. 2015. Effects of alkaline *pretreatments* and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry* 172:836-843.
- Mattjik AA, Sumertajaya IM. 2013. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS an Minitab*. Bogor: IPB Press.
- Mahardika S. 2013. Isolasi dan karakterisasi

- kolagen nanopartikel dari kulit ikan cucut bambu (*Chiloscyllium punctatum*) [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Martianingsih N, Atmaja L. 2009. Analisis sifat kimia, fisik, dan termal gelatin dari ekstraksi kulit Ikan pari (*himantura gerrardi*) melalui variasi jenis larutan asam. Prosiding KIMIA FMIPA – ITS.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* 85:81–89.
- Nur'aenah N. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dan nanopartikel kolagen dari kulit ikan pari (*Pastinachus solocirostris*) sebagai bahan baku *cosmeceutical* [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ogawa M, Moody MW, Portier RJ, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27):8088–8092.
- Ogawa M, Portier RJ, Moody MW, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry* 88(4):495–501.
- Prystupa DA, Donald AM. 1996. Infrared study of gelatin conformations in gel and sol states. *Polymer Gels and Networks* 4:87–110.
- Ratnasari I, Yuwono SS, Nusyam H, Widjanarko SB. 2013. Extraction and characterization of gelatin from different fresh water fishes as alternative sources of gelatin. *International Food Research Journal* 20(6): 3085–3091.
- Rusli A. 2004. Kajian proses ekstraksi gelatin dari kulit ikan patin (*Pangasius hypothalamus*) segar. [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sai S, Jongjareonrak A, Rawdkuen S. 2012. Reextraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant catfish. *Food Bioprocess Technology* 5:1197–1205.
- Shen XR, Kurihara H, Takahashi K. 2007. Characterisation of molecular species of collagen in scallop mantle. *Food Chemistry* 102:1187–1191.
- Shon J, Ji-Hyun E, Hwang SJ, Jong-Bang E. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from Skate (*Raja kenojei*) skins. *Food Science Biotechnology* 20(1):99–106.
- Shyni K, Hema GS, Ninan G, Mathew S, Joshy CG, Lakshmanan PT. 2014. Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids* 39:68–76.
- Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry* 124:97–105.
- Songchotikunpan P, Tattiyakul J, Supaphol P. 2008. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal of Biological Macromolecules* 42:247–255.
- Surewicz WK, Mantsch HH. 1988. New insight into protein secondary structure from resolution enhanced infrared spectra. *Biochimica et Biophysica Acta* 952:115–130.
- Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research*

- International* 54:1499–1505.
- Veruuraj A, Arumugam M, Balasubramanian T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry* 48:1592–1602.
- Wang L, Liang Q, Chen T, Wang Z, Xu J, Maa H. 2014. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids* 38:104-109.
- Yan M, Li B, Zhao X, Ren G, Zhuang Y, Hou H, Zhang X, Chen L, Fan Y. 2008. Characterization of acid soluble collagen from the skin of walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry* 107:1581-1586.
- Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Shirai K. 2000. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 48:685-690.